

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 747 394

②1 N° d'enregistrement national : 96 04655

⑤1 Int Cl<sup>6</sup> : C 12 N 1/20 // (C 12 N 1/20. C 12 R 1:19)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15.04.96.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 17.10.97 Bulletin 97/42.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : RAMBACH ALAIN — FR.

⑦2 Inventeur(s) :

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : REGIMBEAU.

⑤4 MILIEU DE CULTURE POUR LA MISE EN EVIDENCE DES BACTERIES E. COLI ENTEROHEMORRAGIQUES,  
ET PROCEDE POUR SA MISE EN EVIDENCE.

⑤7 L'invention concerne un milieu de culture pour la mise  
en évidence des bactéries E. coli entérohémorragiques, en  
particulier des sérotypes O157 et/ou O11, comprenant un  
composé chromogène substrat de l'enzyme  $\alpha$ -  
galactosidase.

L'invention concerne également un procédé pour la mise  
en évidence de E coli entérohémorragiques dans un prélè-  
vement.

FR 2 747 394 - A1



La présente invention concerne un nouveau milieu d'isolement et d'identification des bactéries *E. Coli* O157 et/ou O11, et un procédé pour leur mise en évidence.

5 *Escherichi coli* entérohémorragique (EHEC), en particulier le sérotype O157, a été à l'origine de la plupart des cas d'intoxications alimentaires aux Etats-Unis, au Canada et en Europe. En Amérique du Nord, la viande de boeuf (crue notamment), les produits à base de boeuf, le lait cru, ont été impliqués dans ces épidémies.

10 Les caractéristiques de virulence de ce germe, identiques à celles des *E. coli* entéropathogènes et des *E. coli* vérotoxigènes font de ce germe un problème majeur de santé publique. En effet, il provoque des colites hémorragiques caractérisées par des diarrhées sanguinolentes, symptômes pouvant évoluer vers des complications rénales très graves (syndrome urémique hémolytique).

15 Les recherches s'orientent donc, ces dernières années, vers la détection rapide des souches EHEC dans les produits alimentaires (FDA, 8th edition, 1995 - Bolton et al., 1995), et plus particulièrement vers une détection spécifique du sérotype O157.

Les milieux d'isolement de l'art antérieur sont :

- 20 - en particulier des milieux peu sélectifs, tels que le milieu MacConkey au sorbitol et examen de toutes les bactéries gram négatives, sorbitol négatives,
- on a parfois ajouté des antibiotiques avec un succès limité car on peut obtenir une inhibition de la croissance des *E. coli* O157 recherchés,
- 25 - on a parfois ajouté un composé fluorogène ou chromogène permettant d'éliminer les colonies de bactéries possédant une  $\beta$ -glucuronidase (essentiellement des *E. coli* typiques).

30 La plupart des souches d'*Escherichia coli* O157 isolées d'épidémies ne fermentent pas le sorbitol en 24 heures, n'a pas d'activité  $\beta$ -glucuronidase et ne se développe pas à 45,5°C. Aussi, beaucoup de méthodes de screening des souches EHEC d'échantillons cliniques ou alimentaires utilisent le sorbitol MacConkey agar (SMAC) comme milieu d'isolement primaire.

Les colonies suspectes sorbitol-négatif sont ensuite confirmées comme *Escherichia coli* O157 par tests biochimiques et sérologiques.

35 Parmi les autres milieux les plus couramment utilisés citons :

- CT-SMAC : milieu dérivé du SMAC, contenant deux inhibiteurs (céfixime et tellurite de potassium) le rendant plus sélectif. En effet, ces composés inhibent de nombreuses bactéries ne fermentant pas le sorbitol, telles que *Proteus* spp, *Morganella morganii*, *Providencia* spp, *Hafnia alvei* ....
- 5 Une étude réalisée en 1993 a montré que près de 400 souches d'*E. coli* O157 EHEC, toutes cultivaient sur le milieu CT-SMAC, permettant la mise en évidence des colonies sorbitol-négatif.
- CR-SMAC : milieu dérivé du SMAC, contenant du céfixime et du rhamnose, pour la mise en évidence des colonies sorbitol-négatif, rhamnose-
- 10 négatif.
- SMAC + MUG (4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide), pour la mise en évidence des colonies sorbitol-négatif,  $\beta$ -glucuronidase-négatif.
- SMAC + BCIG (5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-D- $\beta$ -glucuronide), pour la mise en évidence des colonies sorbitol-négatif,  $\beta$ -glucuronidase-négatif.
- 15 → Gélose Fluorocult *E. coli* O157 : H7 : milieu contenant du sorbitol, du MUG et du thiosulfate de sodium, pour la mise en évidence des colonies sorbitol-négatif, MUG-négatif et H<sub>2</sub>S négatif.

Les variantes du milieu SMAC, milieu peu sélectif au départ, ont été réalisées par addition d'inhibiteurs, contribuant à augmenter la sensibilité d'isolement d'*E. coli* O157 par élimination des flores associées.

Toutefois, les techniques de détection actuelles présentent des inconvénients majeurs, tant du point de vue de la sensibilité que de la spécificité, *E. coli* O157 étant présent en faible quantité dans les échantillons alimentaires, par rapport aux autres germes présents, et aux autres espèces telles que *E. hermanii* ayant les mêmes phénotypes sur les milieux actuels.

La présente invention apporte une solution à ce problème puisqu'il permet une sélectivité et une spécificité améliorée par rapport aux milieux de l'état de la technique, puisque l'addition dans un milieu incolore de chromogène détectant l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase permet de repérer rapidement et aisément les souches de séroroupe O157 et souvent celles de séroroupe O11. Nous obtenons des colorations bien concentrées, dont la couleur dépend de la partie chromophore du chromogène choisi, localisées au niveau des colonies et qui permettent un repérage aisé.

La présente invention concerne donc un nouveau milieu de culture pour la mise en évidence des bactéries *E. coli* entérohémorragiques, en particulier des sérotypes O157 et/ou O11, lequel comprend, outre un milieu

de culture pour *E. coli*, un composé chromogène substrat de l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase.

Pour augmenter la sélectivité, nous pouvons ajouter un composé chromogène substrat de la  $\beta$ -glucosidase qui permet d'éliminer en particulier  
5 un grand nombre de bactéries coliformes.

Pour augmenter la sélectivité, nous pouvons ajouter un composé chromogène substrat de la  $\beta$ -glucuronidase qui permet d'éliminer en particulier la plupart des *E. coli* des sérogroupes autres que O157 et O11.

D'une manière avantageuse, le composé chromogène substrat de  
10 l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase est choisi parmi les dérivés de l'indoxyle- $\alpha$ -galactoside, dont le chromophore est choisi parmi les radicaux indoxyle substitués ou non.

De préférence, le composé chromogène substrat de la  $\beta$ -glucosidase est choisi parmi les dérivés de l'indoxyle- $\beta$ -glucoside, dont le chromophore  
15 est choisi parmi les radicaux indoxyle substitués ou non.

Le composé chromogène substrat de la  $\beta$ -glucuronidase est de préférence choisi parmi les dérivés de l'indoxyle- $\beta$ -glucuronide, dont le chromophore est choisi parmi les radicaux indoxyle substitués ou non.

Par indoxyle substitué ou non, on entend les radicaux indoxyle et  
20 indoxyle substitué par un ou plusieurs radicaux alkyles ou halogènes. Il s'agit plus particulièrement des radicaux indoxyle alkylés, halogénés, di-halogénés ou tri-halogénés, de préférence choisis parmi les radicaux bromo-indoxyle, chloro-indoxyle, dichloro-indoxyle, chloro-bromo-indoxyle, tri-chloro-indoxyle et méthyl-indoxyle.

D'une manière avantageuse, les composés chromophores indoxylés  
25 sont choisis parmi les radicaux 3-indoxyle, 6-chloro-indoxyle, 5-bromo-indoxyle, 3-bromo-indoxyle, 4,6-dichloro-indoxyle, 6,7-dichloro-indoxyle, 5-bromo-4-chloro-indoxyle, 5-bromo-6-chloro-indoxyle ou 4,6,7-trichloro-indoxyle.

D'une manière préférentielle, le composé chromogène substrat de  
30 l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase est choisi parmi les composés suivants :

5-bromo-6-chloro-3-indoxyl- $\alpha$ -galactoside, et  
6-chloro-3-indoxyl- $\alpha$ -galactoside.

Pour les composés chromogènes substrats des enzymes  $\beta$ -glucosidase et/ou  $\beta$ -glucuronidase, le chromophore est de préférence choisi  
35 parmi les radicaux suivants :

5-bromo-4-chloro-3-indoxyle,  
5-bromo-3-indoxyle, et  
3-indoxyle.

D'une manière avantageuse, le milieu selon l'invention comprend  
5 entre 0,01 et 0,2 g/l de chromogène substrat de l' $\alpha$ -galactosidase, de  
préférence environ 0,05 g/l.

Le cas échéant, la concentration des composés chromogènes  
substrats de la  $\beta$ -glucosidase et/ou  $\beta$ -glucuronidase est également comprise  
entre 0,01 et 0,2 g/l, de préférence environ 0,05 g/l.

10 D'autres caractéristiques des milieux selon l'invention  
apparaîtront à la lumière des exemples ci-dessous.

Exemple 1 :

	Formulation CHROMagar O157	en g/l
	agar	15
15	peptone	5
	extrait de levure	2
	extrait de viande	1
	NaCl	5
	5-bromo-6-chloro-3-indoxyl- $\alpha$ -galactoside	0,05
20	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -glucoside	0,05
	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -glucuronide	0,05
	désoxycholate	0,5

Exemple 2 : Colorations obtenues par différentes souches

On inocule le milieu de culture avec différentes souches de  
25 bactéries, puis on laisse incuber 24 heures.

	Mac Conkey Sorbitol	CHROMagar O157
	Coliformes	bleu
	<i>E. coli</i> typique	bleu
	<i>E. coli</i> O157	violet
30	<i>E. hermanii</i>	incolore
	<i>Hafnia alvei</i>	incolore
	<i>Proteus mirabilis</i>	incolore
	<i>Pseudomonas</i>	incolore

On trouve même des souches de *E. coli* O157 qui sont pourtant SLT+  
35 (Shigella Like Toxine positives) avec le caractère sorbitol positif et qui sont  
détectées par le milieu de l'invention, tandis qu'elles sont faussement  
négatives, rouges sur milieu Mac Conkey sorbitol, et donc manquées. Le

milieu de l'invention apporte donc non seulement un avantage de spécificité (élimination de faux positifs) mais apporte un avantage de sensibilité (détection de souches faussement négatives sur milieu Mac Conkey sorbitol) ce qui est très important.

5 De plus, le milieu de l'invention donne un bon rendement de croissance car, sauf de manière élective pour inhiber les bactéries gram positives, le milieu n'est pas fondé principalement sur un principe de croissance sélective.

10 La présente invention concerne également un procédé de mise en évidence de *E. coli* entérohémorragiques dans un prélèvement, dans lequel on inocule le milieu de culture selon l'invention avec le prélèvement ou un inoculum dudit prélèvement, puis on détecte le cas échéant la présence de *E. coli* entérohémorragiques.

15 Dans le domaine de la microbiologie alimentaire, on recherche par exemple à démontrer qu'il y a moins de dix bactéries *E. coli* O157:H7 dans un aliment. On emploie une méthode de croissance microbienne puis éventuellement une méthode d'enrichissement par immunocapture IMS avant étalement, à l'aide d'anticorps accrochés sur des billes. Cependant, cet enrichissement n'élimine pas plusieurs bactéries qui donnent des faux  
20 positifs sur les milieux de l'art antérieur. L'utilisation du milieu selon l'invention apporte donc un avantage crucial même si l'on utilise cette méthode IMS d'enrichissement par immunocapture.

### REVENDECATIONS

1/ Milieu de culture pour la mise en évidence des bactéries *E. coli* entérohémorragiques, en particulier des sérotypes O157 et/ou O11, caractérisé en ce qu'il comprend, outre un milieu de culture pour *E. coli*, un composé chromogène substrat de l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase.

2/ Milieu de culture selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé chromogène substrat de l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase est choisi parmi les dérivés de l'indoxyl- $\alpha$ -galactoside, dont le chromophore est choisi parmi les radicaux indoxyle substitués ou non.

3/ Milieu de culture selon la revendication 2, caractérisé en ce que le chromophore du composé chromogène substrat de l'enzyme  $\alpha$ -galactosidase est choisi parmi les radicaux suivants :

5-bromo-6-chloro-3-indoxyl- $\alpha$ -galactoside, et  
6-chloro-3-indoxyl- $\alpha$ -galactoside.

4/ Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend un composé chromogène substrat de la  $\beta$ -glucosidase, et/ou un composé chromogène substrat de la  $\beta$ -glucuronidase.

5/ Milieu de culture selon la revendication 4, caractérisé en ce que le composé chromogène substrat de la  $\beta$ -glucosidase est choisi parmi les dérivés de l'indoxyle- $\beta$ -glucoside, et/ou le composé chromogène substrat de la  $\beta$ -glucuronidase est choisi parmi les dérivés de l'indoxyle- $\beta$ -glucuronide, dont le chromophore est choisi parmi les radicaux indoxyle substitués ou non.

6/ Milieu de culture selon la revendication 5, caractérisé en ce que le chromophore du composé chromogène substrat de l'enzyme  $\beta$ -glucosidase et/ou du composé chromogène substrat de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase est choisi parmi les radicaux suivants :

5-bromo-4-chloro-3-indoxyle,  
5-bromo-3-indoxyle, et  
3-indoxyle.

7/ Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la concentration du composé chromogène substrat de l' $\alpha$ -galactosidase est comprise entre 0,01 et 0,2 g/l, de préférence environ 0,05 g/l.

8/ Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la concentration des composés chromogènes substrats

de la  $\beta$ -glucosidase et/ou de la  $\beta$ -glucuronidase est comprise entre 0,01 et 0,2 g/l, de préférence 0,05 g/l.

5        9/ Procédé de mise en évidence de *E. coli* entérohémorragiques dans un prélèvement, caractérisé en ce que l'on inocule le milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 8, avec le prélèvement ou en inoculum provenant dudit prélèvement et en ce que l'on détecte le cas échéant la présence de *E. coli* entérohémorragiques.

10       10/ Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'on emploie au préalable une méthode de croissance microbienne du prélèvement, puis éventuellement une méthode d'enrichissement par immunocapture IMS, avant d'inoculer le milieu de culture.



INSTITUT NATIONAL

de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 528796  
FR 9604655

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO-A-95 04157 (RAMBACH ALAIN) 9 Février 1995 * page 2, ligne 30 - page 3, ligne 23 * * page 6, ligne 5-14 *	1-8
Y	---	3
Y	JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS, vol. 51, no. 4, 1993, USA, pages 185-187, XP000196712 T. D'AMORE ET AL.: "X-alpha-Gal medium" * abrégé *	3
X	FR-A-2 696 476 (RAMBACH ALAIN) 8 Avril 1994 * page 2, ligne 12-20 *	5,6
X	WO-A-94 08043 (RAMBACH ALAIN) 14 Avril 1994 * page 2, ligne 12-20; exemple 1 *	5,6,8
X	US-A-5 210 022 (ROTH JONATHAN N ET AL) 11 Mai 1993 * abrégé *	5,6
A	DATABASE WPI Week 9214 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-110005 XP002020743 & JP-A-04 051 900 ((NISR) NISSUI PHARM KK) , 20 Février 1992 * abrégé *	1-3
---		
-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
18 Décembre 1996		Mateo Rosell, A.M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire I : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. U : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1  
EPI FORM 1503 QJ.82 (PMCLJ)

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	JOURNAL OF FOOD PROTECTION, vol. 51, no. 5, 1988, USA, pages 402-404, XP000196707 E.W. FRAMPTON: "Evaluation of the beta-glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuron ide (X-GLUC) in 24-hour direct plating method for Escherichia coli" * le document en entier *	5,6
A	LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 13, 1991, GB, pages 212-215, XP000196715 I.D. OGDEN AT AL.: "An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of Escherichia coli" * le document en entier *	5,6
A	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 53, no. 10, 1987, USA, pages 2394-2396, XP000196714 M.P. DOYLE ET AL.: "Isolation of Escherichia coli 0157:H7 from retail fresh meats and poultry" * le document en entier *	9
A	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 54, no. 10, 1988, USA, pages 2536-2540, XP000196713 E.C.D. TODD ET AL.: "Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of Escherichia coli 0157 in foods" * le document en entier *	9,10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
18 Décembre 1996		Mateo Rosell, A.M.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encadre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	WO-A-92 02820 (WISCONSIN ALUMNI RES FOUND) 20 Février 1992 * le document en entier * -----	10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
18 Décembre 1996		Mateo Rosell, A.M.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>I : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		